



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Genética y Biotecnología**

## **Evaluación de reactividad cruzada de los venenos de las serpientes *Crotalus atrox* y *Trimeresurus puniceus* frente al antiveneno botrópico peruano mediante ensayos de inmunoafinidad**

### **TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**Para optar el Grado de Bachiller en Genética y Biotecnología**

#### **AUTOR**

**Jorge Alejandro ELECTO OSHIYAMA**

#### **ASESOR**

**Fanny Elizabeth LAZO MANRIQUE**

**Lima, Perú**

**2021**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Electo, J. (2021). *Evaluación de reactividad cruzada de los venenos de las serpientes Crotalus atrox y Trimeresurus puniceus frente al antiveneno botrópico peruano mediante ensayos de inmunofluorescencia*. [Trabajo de investigación de bachiller, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---

### Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Jorge Alejandro Electo Oshiyama
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	75266986
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-0955-198X">https://orcid.org/0000-0002-0955-198X</a>
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Fanny Elizabeth Lazo Manrique
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07186191
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0003-2634-1631">https://orcid.org/0000-0003-2634-1631</a>
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Gustavo Adolfo Sandoval Peña
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41020762
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Jorge Antonio Zeballos Alva
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07544388
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Margarita Rosa Eugenia Velasquez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25594148

Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.3.1. Salud Pública
Grupo de investigación	Grupo de Investigación de Toxinas de Origen Animal y sus Antivenenos - TOXIVEN
Agencia de financiamiento	<p>Perú. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación-(FONDECYT). Contrato N° 101-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV</p> <p>Peru. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Convocatorio PCONFIGL. B19100461</p>
Ubicación geográfica de la investigación	<p>Edificio: Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Biología Molecular. Universidad Nacional Mayor de San Marcos</p> <p>País: Perú</p> <p>Departamento: Lima</p> <p>Provincia: Lima</p> <p>Distrito: Cercado de Lima</p> <p>Calle: Av. Venezuela cdra. 34, Av Universitaria</p> <p>Latitud: -12.0599658</p> <p>Longitud: -77.082044</p>
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019-2021
URL de disciplinas OCDE	<p>Bioquímica, Biología Molecular</p> <p><a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03</a></p>



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
(Universidad del Perú, Decana de América)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER EN GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN)**

Siendo las 10:03 horas del 29 de setiembre de 2021, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://meet.google.com/fjo-pymp-hcv>, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Grado Académico de Bachiller en Genética y Biotecnología** de **JORGE ALEJANDRO ELECTO OSHIYAMA**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20210055424, la graduando expuso su Trabajo de Investigación: **“EVALUACIÓN DE REACTIVIDAD CRUZADA DE LOS VENENOS DE LAS SERPIENTES *Crotalus atrox* Y *Trimeresurus puniceus* FRENTE AL ANTIVENENO BOTRÓPICO PERUANO MEDIANTE ENSAYOS DE INMUNOAFINIDAD”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **19**, calificativo: **APROBADO CON MÁXIMOS HONORES**.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Grado Académico de Bachiller en Genética y Biotecnología** a **JORGE ALEJANDRO ELECTO OSHIYAMA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo grado, conforme a ley.

Siendo las 11:50 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 29 de setiembre de 2021.



Firmado digitalmente por SANDOVAL  
PENÁ Gustavo Adolfo FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 29.09.2021 11:37:39 -05:00

---

**Mg. GUSTAVO SANDOVAL PEÑA**  
(PRESIDENTE)



Firmado digitalmente por LAZO  
MANRIQUE Fanny Elizabeth FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 29.09.2021 11:35:06 -05:00

---

**Dra. FANNY LAZO MANRIQUE**  
(ASESORA)

---

**Blgo. JORGE ZEBALLOS ALVA**  
(MIEMBRO)



Firmado digitalmente por  
VELASQUEZ REINOSO Margarita  
Rosa Eugenia FAU 20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 29.09.2021 11:31:27 -05:00

---

**Blga. MARGARITA VELASQUEZ REINOSO**  
(MIEMBRO)

**El presente Trabajo de Investigación fue desarrollado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, gracias al apoyo financiero proporcionado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) mediante el Contrato N° 101-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV y del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM (PCONFIGI B19100461).**

## ***DEDICATORIA***

Agradezco a mi papá que está en el cielo por su fe en mi persona, a mi mamá, quién me dio la vida, por su apoyo incondicional en los momentos difíciles y enseñarme con valores que con la dedicación y esfuerzo constante se logra conseguir grandes objetivos en la vida. Además, agradecerle a ella y a mi hermano por su amor, respeto y momentos compartidos y memorables, los cuales forman parte de la historia de la familia y perdurarán en nuestros recuerdos del pasado. Gracias por haber formado parte de mi vida.



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Armando Yarlequé, responsable del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, por toda la confianza otorgada, la oportunidad de formar parte del Laboratorio de Biología Molecular, del Grupo de Investigación TOXIVEN, por todas las facilidades que me brindó para la realización de este trabajo, y por todos los consejos, enseñanzas conocimientos, críticas y análisis riguroso en los experimentos fueron muy importantes para mejorar cada ensayo durante el desarrollo de la investigación.

Al Dr. Dan Vivas, por los consejos brindados a lo largo de estos años, tanto en el aspecto académico como en el personal, los cuales me ayudaron a mejorar como persona y a crecer como investigador. De igual manera, por las múltiples recomendaciones y correcciones aplicadas en el desarrollo de este trabajo.

Al Mg. Gustavo Sandoval, por las críticas constructivas y consejos en el desarrollo de este trabajo, así como por sus múltiples enseñanzas otorgadas en los cursos de la carrera, las cuales resultaron ser bastante valiosas para mi formación académica en general.

A la Dra. Fanny Lazo, por el asesoramiento de este trabajo, las múltiples correcciones realizadas y las sugerencias brindadas, además de las experiencias compartidas durante mi estadía en el laboratorio.

A la Mg. Edith Rodríguez, por los consejos, críticas y las enseñanzas brindadas, los cuales permitieron mejorar mi forma de trabajo en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Daniel Torrejón, Alex Proleón, Lorgio Bautista, Andrés Agurto, Jordano Espinoza, Carmen Cayo, por brindarme su ayuda desinteresada en diversos puntos en la realización de este trabajo, tanto en los trabajos de laboratorio desarrollado como en el serpentario, siendo muy importantes en los procesos de estandarización de las metodologías que fueron utilizadas. Además, por todas las experiencias amenas compartidas en estos últimos años.

Así también, a muchos de mis compañeros y amigos de la Base 16, con quienes compartí las mejores experiencias en mi carrera universitaria.

## INDICE

<b>Introducción</b> .....	<b>9</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>14</b>
<b>Objetivos de la investigación</b> .....	<b>20</b>
<b>Formulación de la hipótesis</b> .....	<b>20</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>21</b>
1. Material biológico .....	21
2. Reactivos .....	21
3. Equipos .....	23
4. Métodos .....	24
4.1. Cuantificación de proteínas .....	24
4.2. Preparación de la columna de afinidad .....	24
4.3. Cromatografía de inmunoadfinidad .....	25
4.4. Reactividad cruzada de los venenos de <i>Trimeresurus puniceus</i> y <i>Crotalus atrox</i> .....	26
<b>Resultados</b> .....	<b>27</b>
1. Material biológico .....	27
2. Preparación de la columna de inmunoadfinidad .....	29
3. Cromatografía de inmunoadfinidad con el veneno de <i>Bothrops atrox</i> .....	29
4. Reactividad cruzada con el veneno de <i>Trimeresurus puniceus</i> y <i>Crotalus atrox</i> .....	31
<b>Discusión</b> .....	<b>34</b>
1. Cuantificación de proteínas .....	35
2. Ensayos de inmunocromatografía del veneno de <i>Bothrops atrox</i> .....	37
3. Ensayos de inmunocromatografía del veneno de <i>Crotalus atrox</i> y <i>Trimeresurus puniceus</i> ..	39
<b>Conclusiones</b> .....	<b>43</b>
<b>Recomendaciones</b> .....	<b>44</b>
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	<b>45</b>

## ABREVIATURAS

HCl	:	Ácido clorhídrico
kDa	:	kilodalton
M y mM	:	Molar y milimolar
mg y µg	:	Miligramo y microgramo
mL, µL	:	mililitro y microlitro
NaCl	:	Cloruro de sodio
nm	:	nanómetro
PAGE	:	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	:	Buffer fosfato salino
pH	:	Potencial de hidrógeno
PSA	:	Persulfato de amonio
rpm	:	Revoluciones por minuto
SDS	:	Sodio dodecil sulfato
TEMED	:	N,N,N,N'-tetrametiletilendiamino
Tris	:	Tris (hidroximetil) amino metano

## RESUMEN

El accidente ofídico u ofidismo, es considerado una enfermedad tropical desatendida que afecta a las poblaciones rurales de los continentes de Asia, África y América. El único tratamiento científicamente válido para combatir el ofidismo es la administración de un antiveneno, el cual es una mezcla de anticuerpos producidos mediante la inmunización de animales con venenos de serpientes relevantes en la región y este posee la capacidad de neutralizar la actividad tóxica de los venenos con alta eficacia; sin embargo, existe poca disponibilidad de antivenenos en múltiples regiones del mundo, lo cual afecta principalmente a las poblaciones más vulnerables de Asia y África. Frente a esto, diversos estudios reportan que los antivenenos poseen la capacidad de reconocer componentes proteicos de venenos de especies que no han sido utilizadas en su producción, fenómeno conocido como reactividad cruzada y este proceso puede ser aprovechado para extender el alcance de los venenos disponibles, a regiones carentes de antivenenos. El Instituto Nacional de Salud (INS) produce tres antivenenos comerciales los cuales son utilizados para los géneros de serpientes más importantes del Perú. En el presente informe se presenta la utilización del antiveneno botrópico polivalente para la realización de ensayos de reactividad cruzada de los venenos de las serpientes foráneas *Crotalus atrox* y *Trimeresurus puniceus* mediante el diseño y aplicación de una metodología de cromatografía de afinidad, con el fin de crear una matriz de inmunoafinidad para estudiar la interacción entre los venenos y sus respectivos antivenenos.

**Palabras Clave:** Antibotrópico, reactividad cruzada, inmunoafinidad, *Crotalus atrox*, *Trimeresurus puniceus*.

## ABSTRACT

Snake envenomation is considered a neglected tropical disease that affects rural populations on the continents of Asia, Africa, and America. The only scientifically valid treatment to treat the envenomation is the administration of an antivenom which is a mixture of antibodies produced by immunizing animals with relevant snake venoms in the region and this could neutralize the toxic activity of the venoms with high efficiency. However, multiple regions of the world do not count with antivenoms, which mainly affects the most vulnerable populations in Asia and Africa. Various studies report that antivenoms can recognize protein components of venoms from species that have not been used in their production, a phenomenon known as cross-reactivity, and it is proposed that this event can be used to extend the effectiveness of the antivenoms in antivenom-deficient regions. The National Institute of Health (INS) produces three commercial antivenoms which are used for the most important snake genera in Peru. This report presents the use of polyvalent botropic antivenom for the performance of cross-reactivity tests of venoms of foreign snakes *Crotalus atrox* and *Trimeresurus puniceus* by designing and applying an immunoaffinity chromatography methodology.

**Keywords:** Antibothropic, cross-reactivity, immunoaffinity, *Crotalus atrox*, *Trimeresurus puniceus*.

## INTRODUCCIÓN

El accidente ofídico u ofidismo, es una enfermedad tropical desatendida de categoría A, establecido así por la Organización Mundial de la Salud (Chippaux, 2017A). Se estima que anualmente, ocurren aproximadamente entre 1.8 a 2.7 millones de envenenamientos, causando entre 81 410 y 137 880 muertes y un número mayor de víctimas no mortales con secuelas permanentes (WHO, 2020). Las regiones de África subsahariana, Sudeste de Asia y América presentan más casos de ofidismo, afectando especialmente a las poblaciones rurales dedicadas a la agricultura extensiva (Longbottom et al., 2018). El Sureste de Asia presenta el mayor número de casos de envenenamientos a nivel mundial, esto debido a la alta densidad poblacional que convive con un gran conjunto de especies altamente venenosas (Alirol et al., 2010). Por otro lado, en África subsahariana los estudios epidemiológicos han demostrado una alta heterogeneidad en el número de accidentes ofídicos en la región; sin embargo, se estima que estos sean entre 3 a 5 veces mayores en las regiones rurales donde además la atención médica y disponibilidad de tratamientos es limitada (Chippaux, 2011; Ochoa et al., 2018). En América diversos estudios estiman un aproximado de 150,000 envenenamientos anuales los cuales se basan en la literatura presente por cada país en distintos periodos de tiempo, pero esta información posee poca representación real para cada región, además de encontrarse fragmentada dificultando obtener estimaciones exactas del estado epidemiológico del continente, lo cual promueve el incremento de políticas públicas para el monitoreo de los envenenamientos en cada país de la

región (Chippaux, 2017B). En la actualidad se observa que la mayor incidencia de envenenamientos se produce en la región central y sur del continente, siendo Panamá el país de mayores casos de envenenamientos anuales en Centro América y Brasil, en el sur de América (Greene, 2020). En el Perú, entre el periodo de años del 2000 al 2021 se han reportado 45 439 casos los cuales se distribuyen en 23 departamentos, la mayoría de ellos pertenecen a la selva del país seguido de la costa; además se observó que el número de casos anuales se mantiene constante dentro del periodo mencionado y se concentra en regiones rurales y alejadas, afectando mayoritariamente a varones (Herrada & Leon, 2021; Minsa, 2021)

Actualmente la OMS establece a la administración de antivenenos como el único método científicamente aprobado para tratar el envenenamiento. Los antivenenos son una mezcla de inmunoglobulinas purificadas de tipo IgG a partir del suero de animales inmunizados con los venenos de serpientes de mayor relevancia médica en la región; estos antivenenos se unen a los componentes tóxicos de los venenos mediante el reconocimiento de los epítomos presentes en los péptido y proteínas ofídicas y neutralizan su acción dentro del organismo (León et al., 2018; Ferraz et al., 2019). Los antivenenos han sido ampliamente usados a través de los años y su efectividad ha sido ampliamente demostrada; sin embargo, su producción es complicada ya que se necesita de grandes cantidades de venenos para la inmunización y su manufactura requiere de equipamiento especializado (Sriprapat et al., 2003). Por tal motivo diferentes localidades de África y Asia no cuentan con un antiveneno adecuado; adicionalmente la pérdida de efectividad de los antivenenos con el paso del tiempo conlleva a la necesidad de su producción constante (Habib et al., 2018).

Los venenos de serpientes son mucho más complejos que los venenos de otros animales como arañas y escorpiones (Zelanis y Tashima, 2014), puesto que contienen un gran número de proteínas y péptidos con un amplio espectro de propiedades tóxicas. Las serpientes venenosas comparten familias proteicas, por lo que es posible que estas tengan epítomos comunes lo cual permite a los anticuerpos presentes en los antivenenos reconocer compuestos tóxicos en diferentes contextos moleculares; fenómeno conocido como reactividad cruzada (Ledsgaard et al., 2018).

Este fenómeno puede conceder a los antivenenos, además de la capacidad de reconocer compuestos tóxicos de venenos de serpientes no utilizadas en su preparación, la capacidad de neutralizar su actividad tóxica; por lo cual, puede emplearse como alternativa en el tratamiento de accidentes ofídicos en regiones donde su producción es limitada. Por tal motivo en diferentes países de Asia y África se ha optado por la adquisición de antivenenos producidos en otras regiones donde la capacidad de neutralización cruzada haya sido comprobada para las serpientes de la región (Leong et al., 2014). Por ejemplo, el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica produce el antiveneno llamado EchiTAb-Plus-ICP el cual ha sido producido a partir de los venenos de las serpientes *Echis ocellatus*, *Bitis arietans* y *Naja nigricollis*, el cual posee la capacidad de neutralizar los venenos de las especies *Echis leucogaster* , *Echis pyramidum leakeyi* , *Bitis gabonica* , *Bitis rhinoceros* , y *Bitis nasicornis*, por ello, este antiveneno es distribuido por dicho instituto para tratar los accidentes ofídicos en distintos países del continente africano (Calvete et al., 2010).



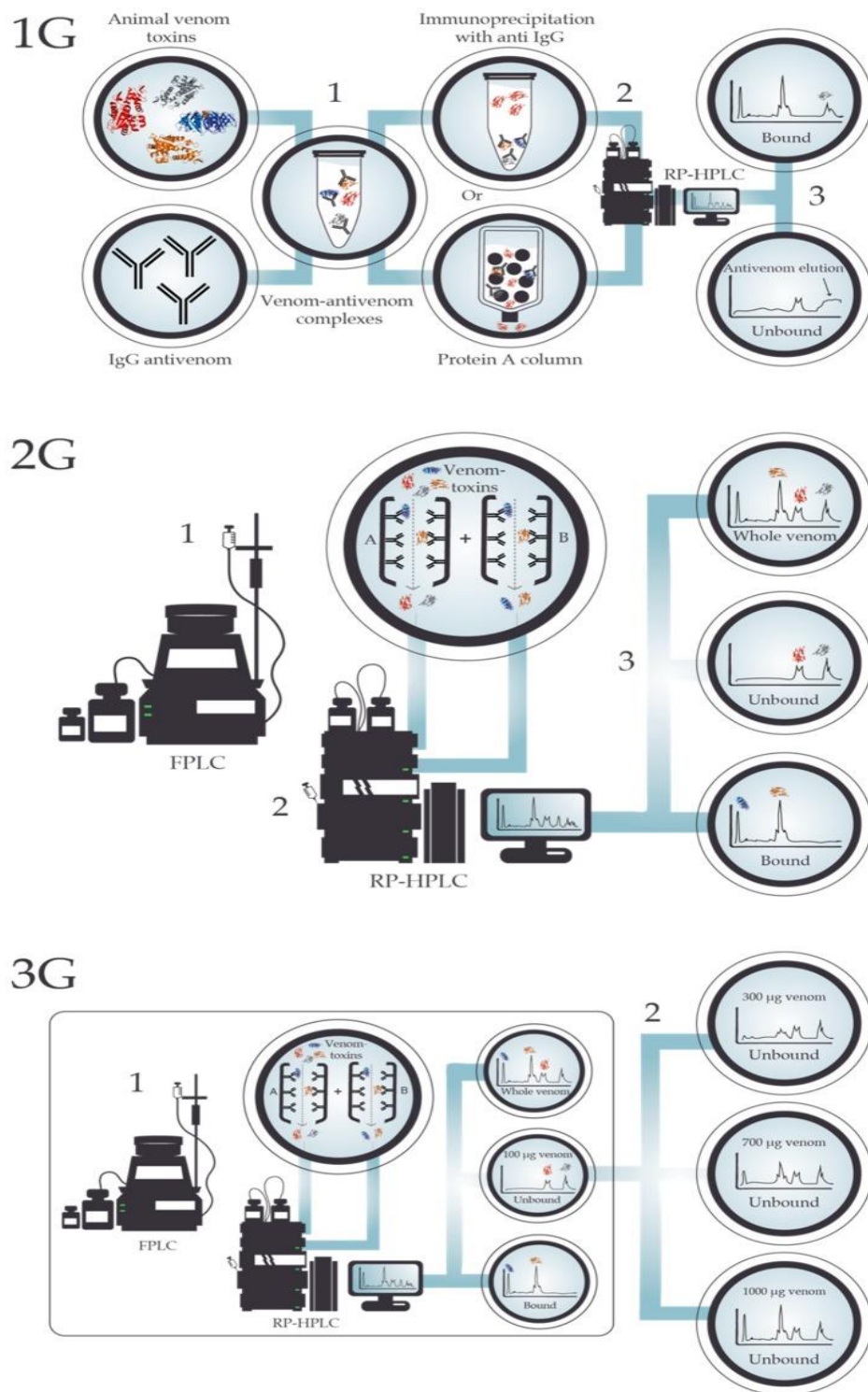
El estudio del fenómeno de reactividad cruzada permite establecer las similitudes inmunogénicas que pueden existir en los componentes del veneno de diferentes especies de serpientes, lo cual se relaciona con la historia evolutiva de dichas especies (Berger et al., 1988). Además, ayuda a determinar relaciones entre especies diferentes a partir de la actividad biológica de su veneno, lo cual puede contribuir al desarrollo de tecnologías para el tratamiento de envenenamientos para un amplio espectro de especies de serpientes venenosas. Por tales motivos, este campo ha despertado el interés de un gran conjunto de investigadores en el mundo los cuales han desarrollado un conjunto de técnicas específicas para la caracterización de venenos y antivenenos a nivel proteómico (Teixeira-Araújo et al., 2017; Calvete et al., 2007).

En el Perú, el Instituto Nacional de Salud (INS) se encarga de la producción y distribución de antivenenos contra los principales géneros de serpientes en el país: *Bothrops*, *Lachesis* y *Crotalus* donde el antiveneno botrópico es de tipo polivalente mientras que el lachesico y crotálico monovalentes (Mendoza R, et al., 2014). Estos antivenenos han sido comparados con antivenenos producidos en países de otras regiones con el fin de comprobar su eficacia (Rojas et al., 2005). Anteriormente se ha podido observar que estos antivenenos pueden reconocer los componentes proteicos de la serpiente asiática *Trimeresurus puniceus* y la serpiente norteamericana *Crotalus atrox* mediante métodos inmunoenzimáticos (Oshiyama et al., 2020); sin embargo, la determinación específica de las proteínas reconocidas por estos antivenenos requiere del desarrollo de técnicas de inmunoafinidad con el fin de incorporarlas a estudios proteómicos.

En el presente estudio, se desarrolló una metodología de producción de una columna de afinidad acoplada covalentemente con las inmunoglobulinas del antiveneno comercial antibotrópico producido por el INS y esta se utilizó para el estudio de reactividad cruzada con los venenos de las serpientes *Trimeresurus puniceus* y *Crotalus atrox* con el fin de establecer un protocolo aplicable en estudios de caracterización proteómica de antivenenos, venenos y con utilidad en la determinación de reactividad cruzada entre estos.

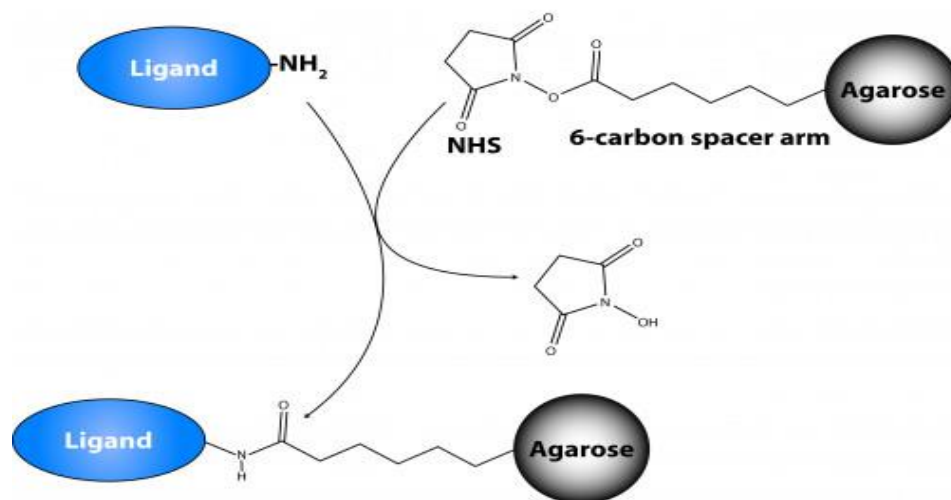
## ANTECEDENTES

Para determinar el grado de reconocimiento que un antiveneno posee frente a determinado veneno es necesario estudiar la interacción de proteínas con los anticuerpos, lo cual en la actualidad se han englobado en un conjunto de técnicas dentro del campo de la “antivenómica” que se basa principalmente en la aplicación de estrategias proteómicas para la caracterización de sueros antiofídicos. Principalmente se han descrito tres generaciones de técnicas antivenómicas, que se diferencian en la forma en la cual los anticuerpos se usan para la interacción con las proteínas del veneno. La **primera generación** involucra la formación de complejos toxina-antiveneno los cuales pueden ser inmunoprecipitados o purificados mediante el uso de una columna acoplada a proteína “A” para separar los complejos de las proteínas no reconocidas. La **segunda generación** se basa en la inmovilización covalente de las inmunoglobulinas en una matriz cromatográfica (columnas de inmunoafinidad) donde posteriormente se pasa el veneno a ensayar para atrapar las proteínas reconocidas por el antiveneno (Gutiérrez et al., 2014). La **tercera generación** de técnicas antivenómicas se basan en la misma metodología de las columnas de inmunoafinidad, pero se enfocan en analizar la máxima capacidad de unión de los antivenenos para cada toxina de veneno a ensayar, así como la cuantificación de los anticuerpos específicos para cierta toxina (Pla et al., 2012) (Ilustración 1).



**Ilustración 1: Modo de funcionamiento de las técnicas antivenómicas de primera (1G), segunda (2G) y tercera generación (3G). Figura obtenida de Ledsgaard et al., 2018: Antibody Cross-Reactivity in Antivenom Research.**

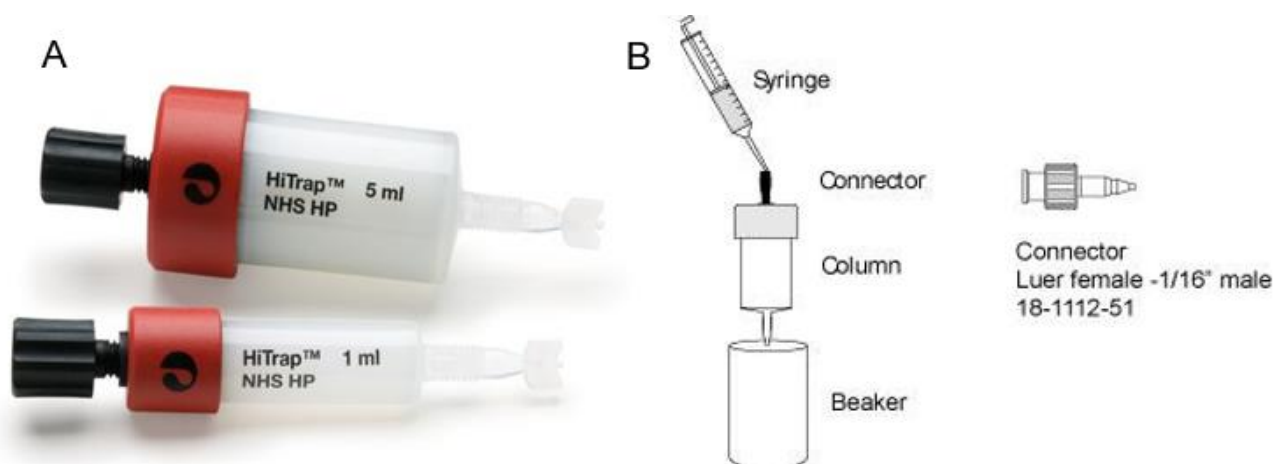
En este contexto el uso de columnas de inmutaafinidad ha sido ampliamente recomendado como punto de inicio de técnicas antivenómicas, para esto se ha propuesto una metodología de inmunocromatografía, la cual se basa en la unión covalente de las inmunoglobulinas a una resina de N-hidroxisuccinimida (NHS) activada, la cual se encuentra diseñada para el acoplamiento de ligandos que contengan grupos amino primarios presenten en péptidos y proteínas (Ilustración 2). Posterior al acoplamiento de la columna con las inmunoglobulinas, se realiza un paso de venenos completos o fracciones de veneno a la columna (Pla et al., 2012). Luego de la inoculación de veneno a la columna, se recupera una fracción de está donde están contenidos aquellas proteínas que no han interactuado con las IgG del antiveneno, mientras que aquellas proteínas reconocidas pueden ser recuperadas posteriormente luego de aplicar una solución que desestabilice la interacción proteína-anticuerpo; la eficiencia en la interacción y recuperación de proteínas depende de la cantidad de veneno y antiveneno utilizado (Sintiprungrat et al., 2016) las fracciones obtenidas son analizadas mediante HPLC seguido por espectrometría de masas.



**Ilustración 2: Esquema de acoplamiento de ligandos con grupos amino primarios mediante el uso de una resina NHS activada. Obtenido de gbiosciences.com**

Esta metodología ha sido empleada para describir la capacidad de reconocimiento de proteínas de los venenos de serpientes del género *Lachesis* por parte de antivenenos monovalente y polivalentes producidos en Brasil (Madrigal et al., 2017); así mismo, esta metodología ha sido incluida en estudios completos de caracterización de venenos de serpientes del complejo *Bothrops* (Sousa et al., 2013) proponiéndose como una metodología necesaria para el estudio del envenenamiento en regiones vulnerables del mundo, como la India que presenta el mayor número de incidencias de envenenamientos en Asia (Warrell et al., 2013)

En la actualidad se ofrece comercialmente un tipo de columnas empaquetadas previamente como por ejemplo el de la tecnología HiTrap NHS activated de la empresa General Electric, la cual está basada en un medio de perlas de agarosa con alto entrecruzamiento, ligadas con un brazo espaciador de 10 átomos que se encuentra unido al final con una matriz de epíclorhidrina activada por la N-hidroxisuccinimida. Este tipo de columnas poseen características positivas para su aplicación en el estudio de ensayos de reactividad cruzada, puesto que la tecnología permite el acoplamiento de los amino primarios presentes en las inmunoglobulinas permitiendo una unión estable a un rango de pH de entre 3 a 12, además de mantener la capacidad de interacción de estas inmunoglobulinas con las proteínas del veneno (Biotech, 2001). Por otro lado, la composición de la columna impide la interacción de esta con otras biomoléculas por lo cual se puede asegurar que la interacción solo se genera por parte de las proteínas IgG del antiveneno. Además, es posible la utilización de estas columnas tanto en sistemas cromatográficos automatizados como en protocolos manuales empleando jeringas permitiendo la estandarización de una metodología de cromatografía de afinidad a nivel básico (Ilustración 3).



**Ilustración 3: (A) Columna NHS activada HiTrap (General Electric) (B) Empleo de la columna de afinidad mediante el uso de jeringas lo cual permite su aplicación a nivel básico. Obtenido de General Electric**

Este sistema ha sido descrito en estudios de caracterización de venenos, específicamente en la identificación de péptidos inmunoreactivos en el veneno de la serpiente *Naja atra* para determinar la capacidad de neutralización de antivenenos contra esta especie (Liu et al., 2018). Debido a que los resultados obtenidos por este estudio muestran la efectividad del uso de esta columna, en el presente estudio se ha propuesto el uso de esta metodología de inmunocromatografía para ensayos de reactividad cruzada.



## OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

- **General:**

Determinar el grado de reactividad cruzada del antiveneno botrópico peruano con los venenos de las serpientes *Trimeresurus puniceus* y *Crotalus atrox* mediante el uso de una columna de cromatografía de afinidad.

- **Específicos:**

- 1) Realizar el acoplamiento de las inmunoglobulinas del antiveneno botrópico a una columna de afinidad NHS activada.
- 2) Determinar el grado de reconocimiento del antiveneno botrópico frente a los venenos de *Trimeresurus puniceus* y *Crotalus atrox*.

## FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

### HIPÓTESIS NULA (H<sub>0</sub>)

- **H<sub>0</sub>**= El uso de columnas de inmunoafinidad no permite analizar el fenómeno de reactividad cruzada de los venenos de las especies *Trimeresurus puniceus* y *Crotalus atrox*.

### HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H<sub>1</sub>)

- **H<sub>1</sub>**= El uso de columnas de inmunoafinidad permite analizar el fenómeno de reactividad cruzada de los venenos de las especies *Trimeresurus puniceus* y *Crotalus atrox*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material Biológico

**Venenos.** - Se emplearon los venenos de las serpientes *Trimeresurus puniceus* (Sureste de Asia), *Crotalus atrox* (Norteamérica) y *Bothrops atrox* (Sudamérica) mantenidas en el serpentario Oswaldo Meneses del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Los venenos fueron extraídos por presión manual de las glándulas y posteriormente liofilizados y conservados a -20 °C hasta su uso.

**Antivenenos.** - Se empleó antiveneno botrópico polivalente liofilizado comercial, producido por el Instituto Nacional de Salud mediante la hiperinmunización de caballos con venenos de las serpientes *Bothrops atrox*, *Bothrops brazili*, *Bothrocophias bilineata*, *Bothrops pictus* y *Bothrops barnetti*. (Lote: 14SAPO2, 2018)

### 2. Reactivos

#### 2.1. Reactivos para cuantificación de proteínas

- *Reactivo de Bradford*
- *Albúmina sérica bovina*

#### 2.2. Soluciones amortiguadoras para cuantificación de proteínas y armado de columna

*Buffer de acoplamiento (Usado en la cuantificación de antivenenos):*

- Bicarbonato de sodio 200 mM
- Cloruro de sodio 500 mM pH 8.3

*Buffer para cuantificación de venenos:*

- Buffer fosfato salino pH 7.0

*Buffer de lavado*

- Acetato de amonio 100 mM
- Cloruro de sodio 500 mM pH 8.3

*Buffer de bloqueo*

- Etanolamina 500 mM
- Cloruro de sodio 500 mM pH 8.3

**2.3. Ensayos de Reactividad Cruzada:**

*a. Electroforesis en condiciones no reductoras:*

- Buffer del gel de resolución: Tris-HCl 1.0 M, pH 8.8
- Buffer del gel de apilamiento: Tris-HCl 1.0 M, pH 6.8
- Buffer de muestra: Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, SDS 2 %, azul de bromofenol 0.125 %, glicerol 10 %
- Buffer de corrida: Tris-HCl 0.025 M, pH 8.3, glicina 0.192 M, SDS 0.1%
- Solución stock de acrilamida (acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.8%)
- N N N' N'-tetrametiletilendiamino
- Persulfato de amonio
- Solución colorante: azul de coomassie 0.05%
- Solución decolorante: metanol, ácido acético, agua (25:8:67)
- Ladder PageRuler (ThermoFisher)

*b. Preparación de la columna de inmutioafinidad*

- Columna HiTrap™ NHS.activated de 1 ml (General Electric)
- HCl 1 mM

*c. Cromatografía de inmutioafinidad*

- Filtros Amicon (10 KDa)
- Ácido acético 10%

*d. Reactivo marcador de peso molecular*

- Marcador de proteína preteñido (10 a 180 kDa; Thermo Scientific)

### **3. Equipos**

- Espectrofotómetro Genesys 5 (Spectronic Ins.)
- Lector de placas de ELISA (SINNOWA ER-500)
- Colector de fracciones (BioFrac™)
- Equipo de electroforesis de proteínas Mini-PROTEAN TetraCell, 4-Gel System (Bio-Rad)
- Fuente de poder (Bio Rad)
- Equipo de transferencia para Western Blot (Cleaver Scientific Ltd)
- Centrífuga easy spin (Sorvall)
- Baño de maría (Memmert)
- pH-metro digital (HANNA)
- Balanza analítica (Ainsworth)
- Balanza digital (Addam)

## **4. Métodos**

### **4.1. Cuantificación de proteínas:**

Se determinó el contenido proteico del antiveneno botrópico y los venenos mediante el método descrito por Bradford (1976), mezclando 0.1 mL de muestra, preparada con buffer de acoplamiento para el caso del antiveneno y PBS para el caso de los venenos, con 3 mL de reactivo Bradford (Sigma) y se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos; posteriormente se midió la absorbancia de la mezcla a 595 nm. La concentración de proteínas en la muestra se determinó a partir de la comparación de éstas con una curva de calibración preparada mediante el uso de albúmina sérica bovina a diferentes concentraciones, las cuales fueron disueltas en buffer de acoplamiento para el caso de cuantificación de antivenenos y PBS para la cuantificación de venenos.

### **4.2. Preparación de la columna de afinidad:**

Se realizó la preparación de una columna de afinidad ligada con antiveneno botrópico utilizando como referencia la metodología descrita por Liu et al., 2018 y siendo modificada en este trabajo tal como se describe a continuación:

En primer lugar, se removió la tapa superior de la columna y se aplicó una gota de solución acidificada helada (HCl 1 mM) y se conectó a la columna una jeringa con 5 mL de dicha solución; posteriormente se aplicaron 2 a 3 volúmenes de esta solución para realizar el lavado del isopropanol usado en la columna como conservante.

Se disolvió 50 mg de antiveneno liofilizado en 1 mL de buffer de acoplamiento y se

aplicó en la columna HiTrap™ NHS-activated HP de 1 mL manteniendo la columna 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó el pase de sucesivos volúmenes de buffer de lavado y buffer de bloqueo, recolectando el volumen eluído (VE) para la cuantificación de proteínas.

Se determinó la eficiencia en el acoplamiento a la columna utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Eficiencia de acoplamiento} = \frac{(IgGt - VEt)}{IgGt} \times 100 \dots (1)$$

Donde:

*IgGt* = Cantidad total de proteína agregada a la columna.

*VEt* = Cantidad total de proteína del volumen eluído.

#### **4.3. Cromatografía de inmunoafinidad:**

Se disolvió un rango de 100 a 500 µg de veneno de *Bothrops atrox* en 1 mL de PBS pH 7.0 y se aplicó a la columna de afinidad; posteriormente se aplicaron 10 mL de PBS con un flujo de 1 mL/min obteniéndose una fracción de proteínas no retenidas por la columna (NR) las cuales fueron concentradas mediante el uso de un filtro Amicon®. La elución de las proteínas retenidas por la columna se realizó mediante la aplicación de 10 mL de ácido acético al 10%, estos fueron colectados y concentrados con el uso de los filtros Amicon®. Posteriormente se realizó la reconstitución de la columna mediante el pase de 2 a 4 volúmenes de PBS pH 7.0.

Se cuantificó la porción no retenida y retenida de la columna para determinar el rendimiento de la columna frente al veneno ensayado, usando la siguiente ecuación:

$$\%Rendimiento = \frac{R}{R + NR} \times 100 \dots (2)$$

Donde:

$R$  = Fracción retenida por la columna

$NR$  = Fracción no retenida por la columna

Se determinó la concentración de proteínas óptimas a disolver en la columna, para posteriormente emplear dicha concentración para realizar los ensayos de reactividad cruzada.

#### **4.4. Reactividad Cruzada de los venenos de *Trimeresurus puniceus* y *Crotalus atrox*.**

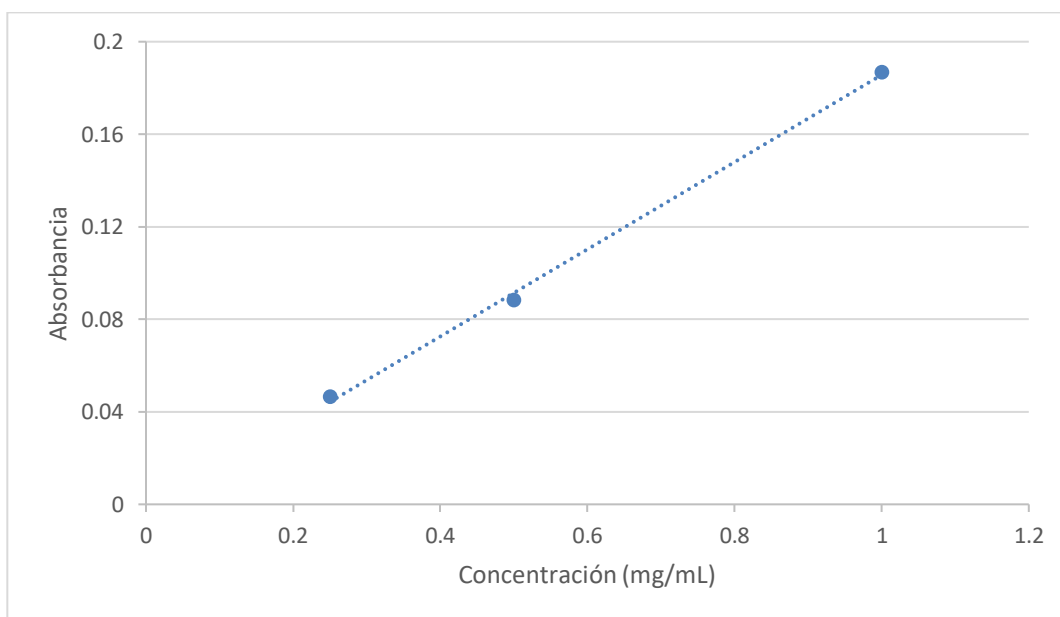
Se disolvieron 500 mg de los venenos de *Trimeresurus puniceus* y *Crotalus atrox* en 1 mL de PBS pH 7.0 y estos fueron utilizados como se describe en la sección anterior. Posteriormente se recolectaron las fracciones de proteínas retenidas y no retenidas de los venenos de *Trimeresurus puniceus* y *Crotalus atrox* las cuales fueron utilizadas para realizar una electroforesis.

Las fracciones retenidas y no retenidas de los venenos de *Trimeresurus puniceus*, *Bothrops atrox* y *Crotalus atrox* fueron tratados con buffer de carga y se aplicaron en un gel de poliacrilamida al 12% bajo condiciones no reductoras. Las muestras se corrieron en una cámara de electroforesis Miniprotean (BioRad) a 100 voltios por 1 hora. Posteriormente el gel se tiñó con una solución de azul brillante de Coomassie (0.05%) por 30 minutos y se decoloró con una solución de metanol, ácido acético y agua (25:8:67) toda la noche. El gel resultante fue analizado posteriormente mediante el programa Gel Analyzer.

## RESULTADOS

### 1. Cuantificación de proteínas:

Se determinó el porcentaje de proteínas presentes en el antiveneno botrópico utilizando la curva de calibración que se muestra en la figura 1 donde se pudo observar una relación lineal entre la concentración de proteínas y absorbancia.



**Figura 1: Curva estándar usando albumina sérica bovina disuelto en buffer de acoplamiento**

A partir de dicha relación entre la absorbancia y concentración, se determinó el porcentaje de proteína presente en una concentración de antiveneno preparado con buffer de acoplamiento (Tabla 1).

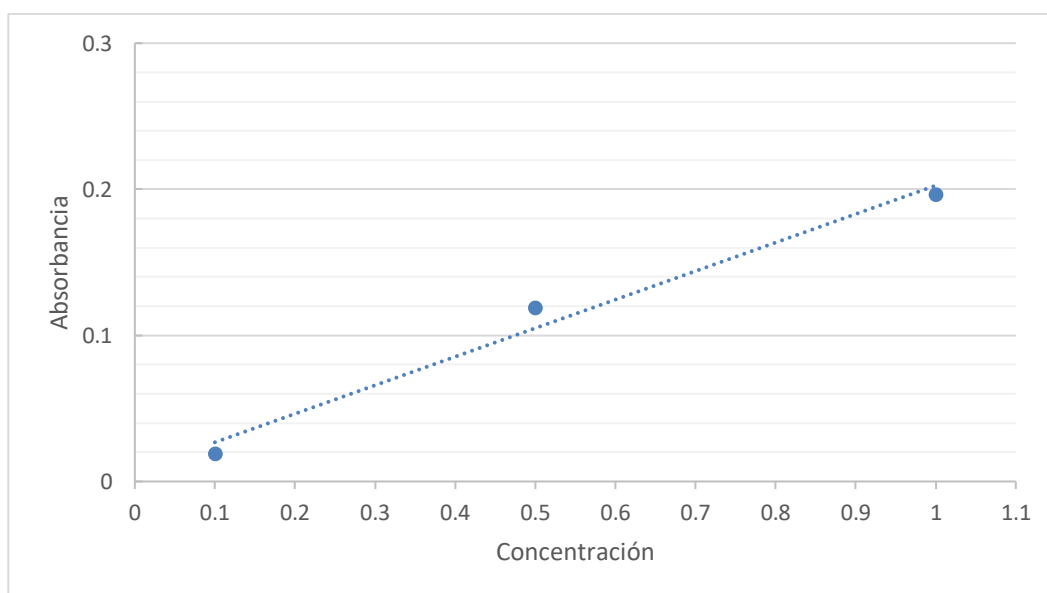


**Tabla 1: Calculo de concentración de proteína contenidas en el antiveneno botrópico**

<b>Concentración de Antiveneno Preparado</b>	<b>Concentración de Proteínas determinada por Bradford</b>	<b>Porcentaje de proteínas</b>
1 mg/mL	0.62 mg/mL	62%
0.5mg/mL	0.29 mg/mL	60%
0.25 mg/mL	0.15 mg/mL	61%

A partir de los resultados presentados en la Tabla 1, se pudo observar que el antiveneno botrópico posee en promedio un 61% de proteínas detectadas por el método de Bradford.

De forma similar a la cuantificación realizada para el antiveneno botrópico, se realizó la construcción de una curva de calibración la cual se muestra en la Figura 2, determinando una relación lineal entre las concentraciones empleadas y las absorbancias.



**Figura 2: Curva estándar obtenida mediante la cuantificación de BSA disuelto en PBS por el método de Bradford**

A partir de la curva de calibración obtenida se procedió a calcular el porcentaje de proteínas presentes en el veneno de *B. atrox*, *C. atrox* y *T. puniceus* (Tabla 2).

**Tabla 2: Porcentaje de proteínas presentes determinado mediante el método de Bradford**

<b>Veneno</b>	<b>Concentración preparada</b>	<b>Concentración total deproteínas</b>	<b>Porcentaje de proteínas</b>
<i>B. atrox</i>	0.5 mg/mL	0.275 mg/mL	55%
<i>T. puniceus</i>	0.5 mg/mL	0.324 mg/mL	65%
<i>C. atrox</i>	0.5 mg/mL	0.337 mg/mL	67.4%

Los valores obtenidos se usaron como referencia, puesto que se requiere la cuantificación de proteínas por cada ensayo de inmunocromatografía

## **2. Preparación de columna de inmuoafinidad:**

Mediante la comparación de los trabajos realizados por Liu y colaboradores en 2018 y el inserto de la columna HiTrap se estableció que la cantidad de ligando óptima para su acoplamiento a la columna se encuentra entre el rango de 15 a 30 mg. Luego de determinar el porcentaje de proteínas en el antiveneno botrópico se decidió emplear 28.0 mg de proteínas totales para el procedimiento. Se observó un aumento en la absorbancia de la fracción eluída y se calculó un total 3.35 mg en dicha fracción. Empleando este dato se determinó el rendimiento de acoplamiento a la columna utilizando la ecuación (1) presentada en el punto 4.2 obteniéndose un rendimiento del 88%.

## **3. Cromatografía de Inmuoafinidad con el veneno de *Bothrops atrox***

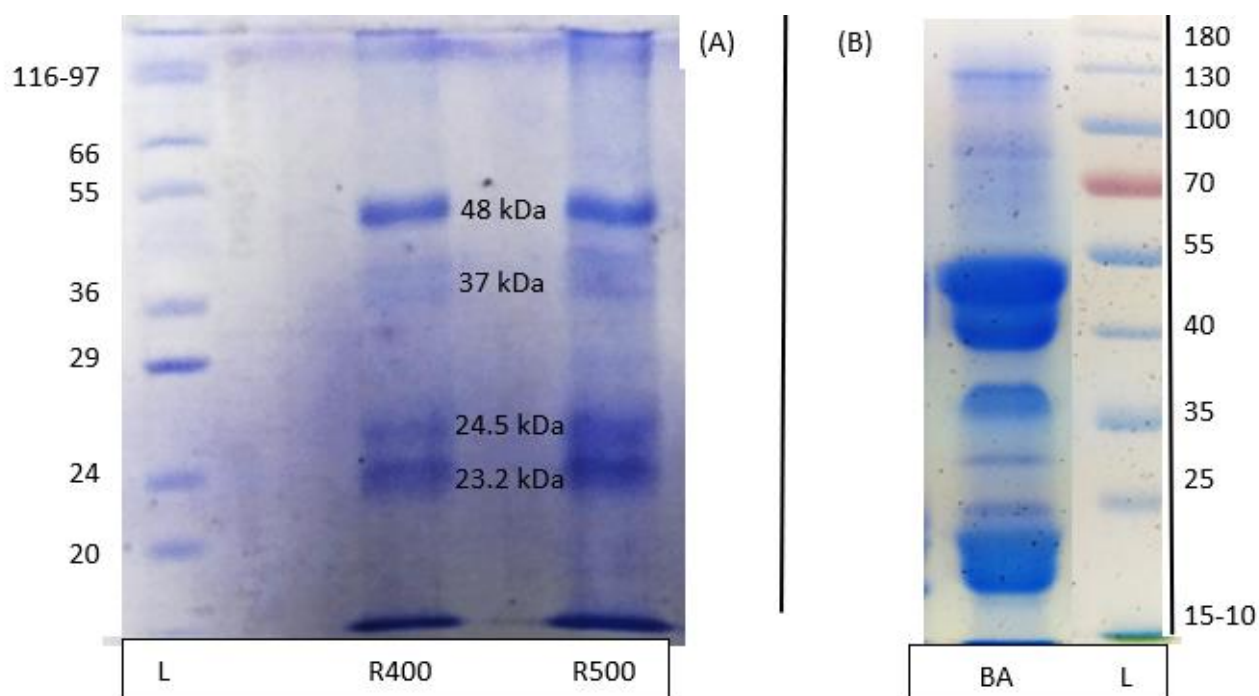
Se utilizaron diferentes cantidades de veneno de *B. atrox* para determinar la concentración óptima de proteínas que se debe aplicar a la columna para la realización de los ensayos de reactividad cruzada. En la Tabla 3 se presentan las

cantidades de proteínas retenidas por la columna de afinidad (R) y las proteínas no retenidas (NR), estas fueron utilizadas para calcular el rendimiento de retención de la columna por medio de la ecuación (2) del punto 4.3. Se observó un aumento del rendimiento de retención de la columna conforme se incrementa la cantidad de veneno aplicada a esta, además de incrementarse las cantidades de proteínas recuperadas tanto en la fracción NR y R. A partir de estos resultados se determinó que cantidades entre 400 a 500 µg son óptimas para agregar a la columna ofreciendo cantidades de proteínas en las fracciones suficientes para los estudios de electroforesis y un alto rendimiento de columna.

**Tabla 3: Recuperación de proteínas del veneno de *B. atrox* obtenidas por cromatografía de inmunoafinidad utilizando una columna ligada con antiveneno botrópico.**

<b>Cantidad de proteínas</b>	<b>55 µg</b>	<b>110 µg</b>	<b>165 µg</b>	<b>220 µg</b>	<b>275 µg</b>
<b>NR (µg)</b>	20.5	10.8	3.6	7.2	23.6
<b>R (µg)</b>	4.5	54.8	98.46	176.8	262.8
<b>Rendimiento (%)</b>	18	83.53	95.96	96.8	93.56

A partir de los resultados obtenidos se utilizaron las fracciones R obtenidas al pasar 220 g y 275 µg de proteínas a la columna para realizar una electroforesis (Figura 3) obteniéndose un patrón de bandas cuyos pesos son similares a los presentes en el veneno crudo de *Bothrops atrox* además obteniendo valores de retención altos.



**Figura 3: (A) Electroforesis al 12% de las fracciones retenidas del veneno de *B. atrox* al aplicar 220  $\mu$ g (R400) y 275  $\mu$ g (R500) de proteínas totales a la columna de afinidad (B) Veneno crudo de *B. atrox* corrido. L= Ladder PageRuler**

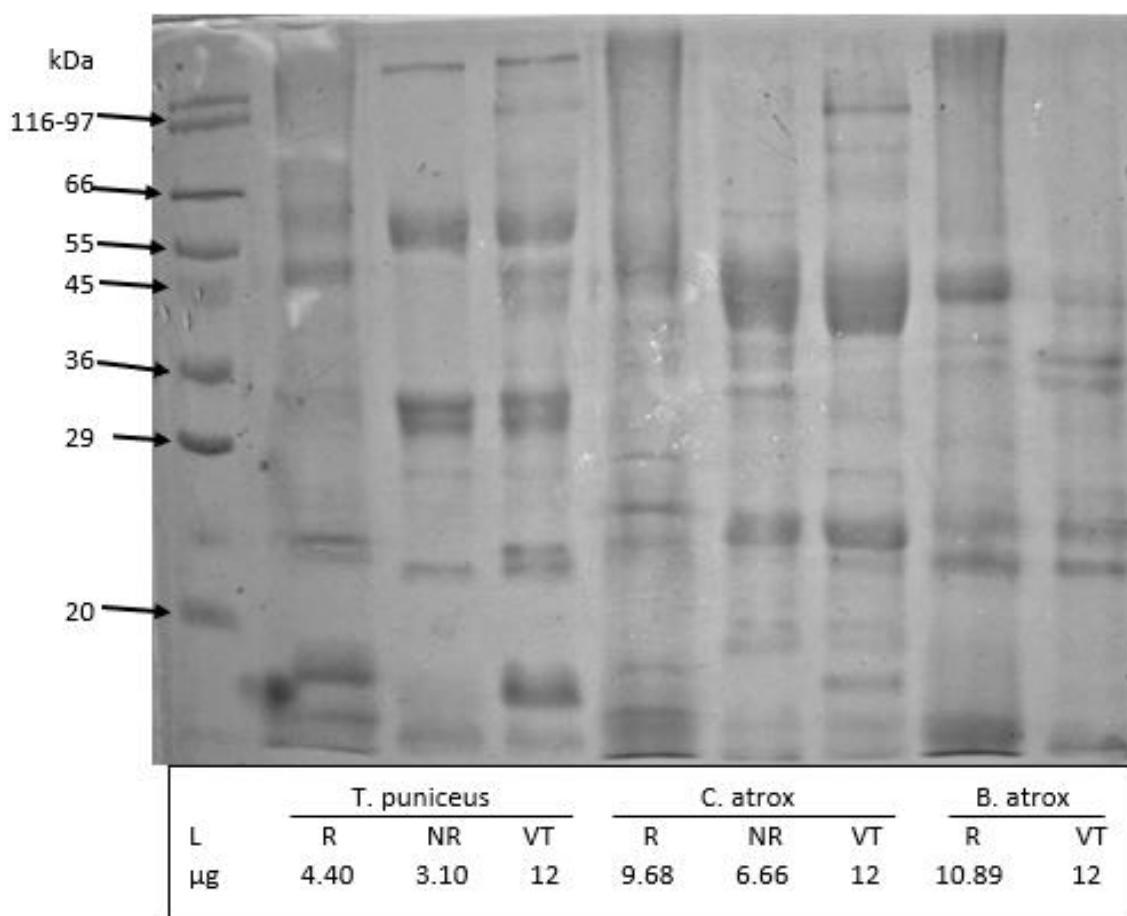
#### **4. Reactividad cruzada con el veneno de *Trimeresurus puniceus* y *Crotalus atrox*.**

Luego de los ensayos cromatografía de inmunoafinidad en el veneno de *Bothrops atrox* se procedió a realizar los ensayos de reactividad cruzada empleando 500  $\mu$ g de veneno de las serpientes *Trimeresurus puniceus* y *Crotalus atrox* recolectándose las fracciones retenidas (R) y no retenidas (NR) por la columna de inmunoafinidad. En la Tabla 1 se pueden observar las cantidades de proteínas detectadas por el método de Bradford para ambas serpientes y el rendimiento obtenido a partir de la ecuación (2).

**Tabla 4: Ensayos de Inmunocromatografía de afinidad de antiveneno botropico de los venenos de las serpientes *T. puniceus* y *C atrox*.**

	<i>Trimeresurus puniceus</i>	<i>Crotalus atrox</i>
<b>CANTIDAD INOCULADA</b>	500 ug	500 ug
<b>NR (µg)</b>	102.8	138.75
<b>R (µg)</b>	146.6	322.6
<b>RENDIMIENTO</b>	58.78%	69.92%
% de proteínas recuperado con respecto veneno a inoculado	49.88%	92.27%

Se observó que existe un porcentaje comparable tanto en las fracciones retenidas y no retenidas por la columna, además de observarse que el rendimiento de retención de la columna es menor al observado con el veneno de *Bothrops atrox*. A partir de las fracciones obtenidas se procedió a realizar una electroforesis tanto de las fracciones R y NR como de los venenos crudos utilizados en la aplicación de la columna los cuales se muestran en la Figura 4.



**Figura 4: Electroforesis de fracciones retenidas y no retenidas por la columna de inmunoafinidad, L = Ladder PageRuler, R= Retenido, NR = No retenido, VT = Veneno total.**

A partir de la electroforesis se pudo observar que las fracciones retenidas y no retenidas poseen bandas presentes en el veneno crudo de la especie en estudios observándose además diferencias entre los patrones obtenidos entre fracciones retenidas y no retenidas.

## DISCUSIÓN

La metodología tradicional para la determinación de la reactividad cruzada se basa principalmente en un análisis mediante técnicas inmunoenzimáticas como ELISA y Western Blot. La primera ofrece la cuantificación del grado de reconocimiento del antiveneno calculado a partir del título de anticuerpos obtenido al enfrentar diluciones sucesivas de antiveneno con una concentración fija de veneno, sin embargo, esta no ofrece la capacidad de discriminar los componentes proteicos reconocidos por el antiveneno a menos que se realicen ensayos ELISA utilizando fracciones de venenos luego de realizar una HPLC (Lauridsen et al., 2016). La segunda requiere de un paso de electroforesis previo donde se utiliza SDS para la desnaturalización de las proteínas y que estas sean cargadas negativa y uniformemente, además de un paso de desnaturalización por calor; esto impide que el resultado obtenido en un Western Blot represente correctamente la capacidad de reconocimiento del antiveneno, puesto que este proceso puede introducir artefactos en el resultado, además de la pérdida de epítopos conformacionales (Williams et al., 2011). Por tal motivo, el uso de columnas de inmunoafinidad pueden ser útiles para permitir la identificación de proteínas reconocidas por un antiveneno además de ofrecer la capacidad de cuantificar el grado de reactividad cruzada por medio del rendimiento de retención y ser el punto de inicio de estudios antivenómicos de segunda y tercera generación. Para poder acoplar las columnas de inmunoafinidad en sistemas de cromatografía automatizados es necesario demostrar, de forma previa, una buena eficiencia en

el acoplamiento de las inmunoglobulinas y que estas posean capacidad de unión a las proteínas del veneno a ensayar, en este trabajo se realizó el armado de una columna de inmunoafinidad con antiveneno botrópico y se realizaron ensayos de inmuncromatografía, presentándose resultados que indicarían la utilidad de la columna para ensayos de reactividad cruzada.

### **1. Cuantificación de Proteínas**

Para la cuantificación de proteínas en el antiveneno botrópico se eligió el método de Bradford, a pesar de que otro estudio recomienda la cuantificación mediante el método de Biuret (Yarlequé et al., 2008). Esta elección se debe a que no se pudo determinar la concentración de proteínas mediante método de Biuret en muestras de antiveneno disueltos en buffer de acoplamiento; ya que la solución no se encuentra dentro del límite de detección de esta prueba (Rodger & Sanders, 2010). Por otro lado, el reactivo Bradford cuenta con un rango de detección más amplio desde 20 hasta 2000 µg/ml (Johnson, 2012).

El porcentaje de proteínas determinado para el antiveneno botrópico fue de 61% (Tabla 1), este porcentaje de cuantificación fue utilizado para determinar la concentración de antiveneno necesaria para aplicar a la columna cuando se proceda con el armado de esta, estableciéndose que la concentración máxima a aplicar a la columna debe ser de 50 mg/mL tomando como referencia otros estudios que emplean la misma metodología de inmuncromatografía (Liu et al., 2018; Pla et al., 2012). Dicha concentración fue definida como la máxima concentración aplicable en la columna, considerándose otros reportes donde se ha observado que la concentración de inmunoglobulinas aplicadas a la columna afecta a la densidad



del ligando en la columna y la eficiencia en la retención. Estos estudios establecen que valores superiores a 30 mg de proteína por mL de buffer de acoplamiento reducen significativamente el rendimiento en el acoplamiento y reconocimiento de la columna, por lo que recomiendan un valor promedio de 20 mg/mL de inmunoglobulinas para ensayos de inmunoafinidad (Sintiprungrat et al., 2016). Por otro lado, se consideró la posible presencia de otros componentes en antivenenos comerciales (Krifi et al., 1999).

De forma similar, para la cuantificación de los venenos se utilizó el método de Bradford (Tabla 2), obteniéndose valores que fueron utilizados de forma referencial, puesto que es necesario realizar una cuantificación por cada ensayo de inmunocromatografía con el fin de calcular el rendimiento del ensayo. El porcentaje de proteínas en la serpiente *B. atrox* (55%) fue menor al calculado en otro estudio por el método de Lowry (68%) y Bradford (71%) (Mendoza et al., 2009; Yarlequé et al., 2012); sin embargo, el porcentaje de proteínas puede variar entre individuos de *B. atrox* dependiendo de su distribución geográfica y edad, encontrándose que el porcentaje de proteínas obtenidas es cercano a los valores de otros trabajos (Málaga et al., 2000).

En el caso de la serpiente *C. atrox* se determinó una concentración del 39%, la cual está basada en veneno crudo extraído y liofilizado, por lo que pueden existir diferencias por variaciones geográficas de la especie (Yarlequé et al., 2012) además, no se encontraron reportes de cuantificaciones con este veneno. Similarmente para la especie no se han encontrado referencias de cuantificación de proteínas, esto debido a la poca información con respecto al complejo de

especies de víboras de fosa cuyos estudios son de tipo proteómico de carácter exploratorio (Kumkate et al., 2020; Wang et al., 2005)

## **2. Ensayos de inmunocromatografía del veneno de *Bothrops atrox***

En el armado de la columna de afinidad se obtuvo un rendimiento de acoplamiento del 88%; este porcentaje indica que el acoplamiento se realizó de forma exitosa; por consiguiente, se determinó que dicha columna posee inmunoglobulinas capaces de retener componentes proteicos de los venenos a trabajar. Se emplearon diferentes concentraciones de veneno de *B. atrox* para demostrar este punto y determinar la concentración de proteínas óptima para aplicar a la columna y obtener resultados de rendimientos óptimos. En la Tabla 3 se encuentran los valores obtenidos en estos ensayos, observándose que el porcentaje de retención aumenta conforme se incrementa la cantidad de veneno aplicado y que existe un máximo de retención en porcentaje.

Otros estudios han mostrado que, dependiendo del grado de afinidad de la proteína con el antiveneno, la cantidad de proteínas retenidas aumenta conforme aumenta la cantidad de proteínas totales aplicadas de veneno hasta llegar a un punto máximo de retención, para posteriormente observarse un aumento en la porción de proteínas no retenidas (Sintiprungrat et al., 2016) este efecto podría indicar que un aumento de proteínas aplicadas a la columna pueden conllevar a la saturación de las inmunoglobulinas con las proteínas afines a esta, liberándose en la porción no retenida proteínas afines a las inmunoglobulinas; en el caso de este estudio se pudo observar una disminución el rendimiento de la columna al aplicar 500 µg de veneno con respecto al valor de 400 µg, esto podría indicar dicho efecto

por lo que se estableció que 500 µg como el máximo de proteínas posible para aplicar en la columna; además, al observarse que la disminución del rendimiento al aplicar 400 µg y 500 µg no es considerable y se logra recuperar mayor cantidad de proteínas para los análisis electroforéticos, se utilizó el valor de 500 µg para los estudios de reactividad cruzada posteriores.

Se realizó la electroforesis de las fracciones retenidas al aplicar 400 y 500 µg de veneno observándose un patrón similar de bandas entre ellas (Figura 3 (A)); la fracción no retenida no pudo ser analizada debido a que no fue posible recuperar una cantidad adecuada de proteínas para su detección por electroforesis. Estos resultados fueron comparados con un patrón electroforético aplicando 40 µg de veneno crudo de *B. atrox* (Figura 3 (B)) observándose la presencia de bandas con pesos similares entre las fracciones retenidas y el veneno crudo. Mediante el análisis del gel mediante el programa Gel Analyzer se pudo calcular que estas bandas tendrían los pesos moleculares presentados en la Figura 3. Al hacer la comparación con estudios previos se pudo observar que las bandas en la región entre las bandas de 55 y 36 kDa pertenecerían a serinoproteasas y metaloproteasas de tipo 3 y las bandas de peso aproximado de 24 kDa a enzimas similares a trombina y metaloproteasas de tipo 1 además de observarse proteínas de menor peso molecular, las cuales pertenecerían a alguna desintegrina entre otros componentes (Kohlhoff et al., 2012). El patrón obtenido es similar a otro reportado donde se realizaron ensayos de Western Blot con el fin de estudiar la inmunogenicidad del veneno de *B. atrox* (Hatakeyama et al., 2020); esta similitud indicaría que la columna es eficiente para la retención de las proteínas reconocidas por el antiveneno botrópico, las cuales pueden ser observables por electroforesis, además

esta metodología puede ser escalado en técnicas antivenómicas las cuales son capaces de caracterizar los antivenenos con una mayor resolución que las técnicas inmunoenzimáticas clásicas (ELISA, Western blot).

### **3. Ensayos de inmunocromatografía de los venenos de *Crotalus atrox* y *Trimeresurus puniceus*.**

Los resultados obtenidos con el veneno de *B. atrox* indican la utilidad de la columna para realizar los estudios de inmunocromatografía por lo que posteriormente se utilizó dicha columna para determinar la capacidad de reactividad cruzada del antiveneno botrópico frente a los venenos de *C. atrox* y *T. puniceus* empleando 500 µg de veneno, valor que fue considerado con el fin de obtener una cantidad aceptable para la realización del ensayo electroforético. No se tomó en cuenta la posible saturación de la columna debido a que se parte de la idea de que el grado de reconocimiento del antiveneno botrópico frente a estos dos venenos sea menor al del veneno de *B. atrox*.

Al realizar la comparación del contenido de proteínas retenidas y no retenidas de cada veneno luego de cada ensayo de inmunocromatografía con respecto a los valores de concentración de proteínas de veneno total; se encontró que estas representan un 49.88% de proteínas con respecto al total inoculado para el caso de *T. puniceus* y 92.27% para el caso de *C. atrox*. El porcentaje determinado para *C. atrox* es similar al reportado en otro estudio (Yarlequé et al., 2012), lo cual

indicaría la necesidad de realizar la cuantificación de las proteínas antes de su aplicación a la columna y posterior a esta.

Por otro lado, el rendimiento de la columna fue menor en el caso de *T. puniceus* (59%) con respecto a *C. atrox* (70%) lo cual indicaría que el antiveneno botrópico tiene la capacidad de reconocer ciertos componentes de dichos venenos, sin embargo, el grado de reconocimiento varía indicando que alguno de sus componentes no es reconocido por el antiveneno.

En la figura 4, se pudo determinar el patrón de bandas de las fracciones no retenidas y retenidas, y estas fueron comparadas con veneno crudo de las serpientes estudiadas y reportes previos del patrón electroforético de estos venenos. En el caso de *Trimesurus* se observó que en la porción retenidase encuentran proteínas de aproximadamente 61 y 48 kDa las cuales pertenecerían a metaloproteasas de tipo 3, además de observarse bandas de menor peso molecular que podrían pertenecer a metaloproteasas de tipo 1 (24 kDa) y proteínas de peso molecular menores a 20 kDa que podrían pertenecer a algunas fosfolipasas y desintegrinas (Mackessy., 2010) de similar forma se observa la presencia de bandas pertenecientes a posibles metaloproteasas y serinoproteasas en la porción no retenida las cuales presentan mayor intensidad de banda lo que significaría mayor abundancia que en la porción no retenida.

Para *C. atrox* se realizó la comparación de bandas con patrones electroforéticos y ensayos venómicos reportados por otros autores (Mackessy, 2008; Calvete et al., 2009), observándose que reconocerían proteínas metaloproteasas de tipo 1 y tipo

3; sin embargo, también se observa que el antiveneno no reconoce todos los tipos de metaloproteasas presente en el veneno de la especie, además que estas son más abundantes en la fracción no retenida (Figura 4).

Estos resultados indican que el antiveneno botrópico tiene mayor capacidad de reconocimiento de metaloproteasas de tipo 3 y de tipo 1, principalmente en los tres venenos estudiados. Los resultados se relacionan con la presencia de una mayor abundancia de metaloproteasas en el proteoma del veneno de diversas especies del género *Bothrops* relacionado a su actividad biológica, además de la semejanza en el dominio catalítico de ambos tipos de proteínas, y de ser estos componentes altamente inmunogénicos (Sousa et al., 2013; Moura-da-Silva et al., 2016) de forma que existe mayor probabilidad de ser reconocidos para especies de serpientes no relacionadas. Previamente se pudo determinar que el antiveneno botrópico es capaz de neutralizar *in vitro* la actividad proteolítica de la serpiente *C. atrox* (Oshiyama et al., 2020) lo cual indicaría la capacidad de neutralizar componentes hemorrágicos de dicho veneno, en este sentido los resultados relacionan la capacidad neutralizante del antiveneno con los componentes reconocidos por éstos, mostrando la efectividad del uso de columnas de afinidad para ensayos de reactividad cruzada. El veneno de *T. puniceus* presenta principalmente actividades que alteran la hemostasis, asociado a coagulopatías donde contribuyen enzimas similares a trombinas y algunas metaloproteasas a nivel local (Lee et al., 2020) por lo que el antiveneno botrópico podría ser capaz de reconocer alguno de dichos componentes tal como se ha determinado en la Figura 4; sin embargo, no se ha podido establecer si esto neutraliza sus principales actividades enzimáticas.

A partir de los resultados obtenidos, se ha podido observar la capacidad del antiveneno botrópico de reconocer componentes del veneno de las serpientes *Crotalus atrox* y *Trimeresurus puniceus* relacionados principalmente con proteínas del tipo de las metaloproteinasas y serinoproteasas. Estos resultados deben ser estudiados con mayor profundidad para la detección y caracterización de los componentes reconocidos por dicho antiveneno y cómo puede influenciar en la actividad biológica durante el envenenamiento; por otro lado, la presencia de estos componentes señalan que existe cierta similitud inmunogénica en los venenos de las especies *Crotalus atrox* y *Trimeresurus puniceus* con las serpientes del género *Bothrops*, lo cual podría ser estudiado mediante el empleo de estas columnas de inmunoafinidad acopladas a la tecnología de la venómica.

## CONCLUSIONES

1. Se preparó una columna de afinidad acoplada con antiveneno botrópico la cual presenta un alto potencial para su uso en estudios de reactividad cruzadas con los venenos de *Trimeresurus puniceus* y *Crotalus atrox*.
2. Se demostró la capacidad de reconocimiento del antiveneno botrópico para el veneno de *Trimeresurus puniceus* para metaloproteasas de tipo tres en un rango entre 48 a 61 kDa y tipo 1 (24 kDa) y proteínas de pesos menores a 20 kDa que pertenece a fosfolipasas y desintegrinas.
3. Se determinó un alto porcentaje de reconocimiento del veneno de la serpiente *Crotalus atrox*, para metaloproteasas de tipo 3 y 1 principalmente.



## RECOMENDACIONES

Gracias al presente estudio se logró desarrollar una metodología de cromatografía de afinidad con utilidad en estudios de caracterización de antivenenos y reactividad cruzada. Estos estudios permitirían establecer la capacidad de ciertos antivenenos para reconocer ciertos componentes tóxicos de serpientes de otras regiones; sin embargo, para establecer que estos son capaces de neutralizar la actividad tóxica de estos venenos es necesario complementar estos estudios con ensayos *in vivo*. Específicamente para las serpientes estudiadas, se recomienda realizar ensayos preclínicos de neutralización de la actividad letal de sus venenos utilizando el antiveneno botrópico.

Por otro lado, la introducción de columnas de inmunofinidad en estudios de reactividad cruzada permitirá su uso en estudios antivenómicos de los antivenenos comerciales peruanos de forma que se permita identificar específicamente las proteínas reconocidas por estos antivenenos; lo cual puede ser utilizado para el diseño de estrategias de producción de antivenenos comerciales de uso extendido en diferentes regiones del mundo o de proteínas multiepitópicas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alirol, E., Sharma, S. K., Bawaskar, H. S., Kuch, U., & Chappuis, F. (2010). Snake bite in South Asia: a review. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(1), e603.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Calvete, J. J., Fasoli, E., Sanz, L., Boschetti, E., & Righetti, P. G. (2009). Exploring the venom proteome of the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*, via snake venomomics and combinatorial peptide ligand library approaches. *Journal of proteome research*, 8(6), 3055-3067.
- Chippaux J. P. (2017A). Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 23, 38. doi:10.1186/s40409-017-0127-6.
- Chippaux, J. P. (2011). Estimate of the burden of snakebites in sub-Saharan África: a meta-analytic approach. *Toxicon*, 57(4), 586-599.
- Chippaux, J. P. (2017B). Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(6), e0005662.
- Ferraz CR, Arrahman A, Xie C, Casewell NR, Lewis RJ, Kool J and Cardoso FC (2019) Multifunctional Toxins in Snake Venoms and Therapeutic

Implications: From Pain to Hemorrhage and Necrosis. *Front. Ecol. Evol.* 7:218. doi: 10.3389/fevo.2019.00218.

- Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., Sanz, L., Calvete, J. J., & Pla, D. (2014). Immunological profile of antivenoms: Preclinical analysis of the efficacy of a polyspecific antivenom through antivenomics and neutralization assays. *Journal of proteomics*, 105, 340-350.
- Habib, A. G., & Brown, N. I. (2018). The snakebite problem and antivenom crisis from a health-economic perspective. *Toxicon*, 150, 115-123.
- Johnson, M. (2012). Protein quantitation. *Materials and Methods*, 2, 115.
- Kohlhoff, M., Borges, M. H., Yarleque, A., Cabezas, C., Richardson, M., & Sanchez, E. F. (2012). Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. *Journal of proteomics*, 75(7), 2181-2195.
- Krifi, M. N., El Ayeb, M., & Dellagi, K. (1999). The improvement and standardization of antivenom production in developing countries: comparing antivenom quality, therapeutical efficiency, and cost. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 5(2), 128-141.

- Kumkate, S., Chanhom, L., Thiangtrongjit, T., Noiphrom, J., Laoungboa, P., Khaw, O., ... & Reamtong, O. (2020). Venomics and Cellular Toxicity of Thai Pit Vipers (*Trimeresurus macrops* and *T. hageni*). *Toxins*, 12(1), 54.
- Lauridsen, L. P., Laustsen, A. H., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2016). Toxicovenomics and antivenom profiling of the Eastern green mamba snake (*Dendroaspis angusticeps*). *Journal of proteomics*, 136, 248-261.
- Ledsgaard, L., Jenkins, T. P., Davidsen, K., Krause, K. E., Martos-Esteban, A., Engmark, M., ... & Laustsen, A. H. (2018). Antibody cross-reactivity in antivenom research. *Toxins*, 10(10), 393.
- Lee, L. P., Tan, K. Y., & Tan, C. H. (2020). Toxicity and cross-neutralization of snake venoms from two lesser-known arboreal pit vipers in Southeast Asia: *Trimeresurus wiroti* and *Trimeresurus puniceus*. *Toxicon*, 185, 91-96.
- León, G., Vargas, M., Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., Sánchez, A., ... & Gutiérrez, J. M. (2018). Current technology for the industrial manufacture of snake antivenoms. *Toxicon*, 151, 63-73.
- Liu, B. S., Wu, W. G., Lin, M. H., Li, C. H., Jiang, B. R., Wu, S. C., ... & Sung, W. C. (2018). Identification of immunoreactive peptides of toxins to simultaneously assess the neutralization potency of antivenoms against neurotoxicity and cytotoxicity of *Naja atra* venom. *Toxins*, 10(1), 10.
- Longbottom, J., Shearer, F. M., Devine, M., Alcoba, G., Chappuis, F., Weiss, D. J., ... & Williams, D. J. (2018). Vulnerability to snakebite envenoming: A global mapping of hotspots. *The Lancet*, 392(10148), 673- 684.

- Mackessy, S. P. (2008). Venom composition in rattlesnakes: trends and biological significance. *The biology of rattlesnakes*, 495, 510.
- Mackessy, S. P. (2010). The field of reptile toxinology: snakes, lizards and their venoms. *Handbook of venoms and toxins of reptiles*, 3, 23.
- Madrigal, M., Pla, D., Sanz, L., Barboza, E., Arroyo-Portilla, C., Corrêa- Netto, C., ... & Calvete, J. J. (2017). Cross-reactivity, antivenomics, and neutralization of toxic activities of *Lachesis* venoms by polyspecific and monospecific antivenoms. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(8), e0005793.
- Málaga, O., Pantigoso, C., Morante, Y., Heredia, V., Cárdenas, J., & Yarlequé, A. (2000). Variaciones en la composición proteica, actividades enzimáticas y biológicas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (vipereidae) en relación con la edad. *Revista Peruana de Biología*, 7(2), 161-170.
- Mendoza, J., Vivas, D., Inga, R., Arbaiza, E., Rodríguez, E., & Yarlequé, A. (2009). Patrones electroforéticos de los venenos de serpientes peruanas de los géneros *Bothrops* y *Lachesis*. *Revista de la Sociedad química del Perú*, 75(2), 235-242.
- Moura-da-Silva, A. M., Almeida, M. T., Portes-Junior, J. A., Nicolau, C. A., Gomes-Neto, F., & Valente, R. H. (2016). Processing of snake venom metalloproteinases: generation of toxin diversity and enzyme inactivation. *Toxins*, 8(6), 183.

- Ochola, F. O., Okumu, M. O., Muchemi, G. M., Mbaria, J. M., & Gikunju, J. K. (2018). Epidemiology of snake bites in selected areas of Kenya. *Pan African Medical Journal*, 29(1), 1-14.
- Oshiyama, J. A. E., Vivas-Ruiz, D. E., Torres, A. D. P., Arteaga, A. A., Lazo, F., & Yarleque, A. (2020). Cross-neutralization Assays of *Trimeresurus Puniceus* and *Crotalus atrox* Venoms by Peruvian Antivenoms. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 177, S35.
- Pla, D., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2012). Second generation snake antivenomics: comparing immunoaffinity and immunodepletion protocols. *Toxicon*, 60(4), 688-699.
- Rodger, A., & Sanders, K. (2010). Biomacromolecular applications of UV-visible absorption spectroscopy. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (pp. 166-173). Elsevier.
- Sintiprungrat, K., Chaisuriya, P., Watcharatanyatip, K., & Ratanabanangkoon, K. (2016). Immunoaffinity chromatography in antivenomics studies: Various parameters that can affect the results. *Toxicon*, 119, 129-139.
- Sousa, L. F., Nicolau, C. A., Peixoto, P. S., Bernardoni, J. L., Oliveira, S. S., Portes-Junior, J. A., ... & Valente, R. H. (2013). Comparison of phylogeny,

venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of *Bothrops* complex. PLoS Negl Trop Dis, 7(9), e2442.

- Sriprapat, S., Aeksowan, S., Sapsutthipas, S., Chotwiwatthanakun, C., Suttijitpaisal, P., Pratanaphon, R., ... & Ratanabanangkoon, K. (2003). The impact of a low dose, low volume, multi-site immunization on the production of therapeutic antivenoms in Thailand. Toxicon, 41(1), 57-64.
- Wang, Y. M., Peng, H. F., & Tsai, I. H. (2005). Unusual venom phospholipases A2 of two primitive tree vipers *Trimeresurus puniceus* and *Trimeresurus borneensis*. The FEBS journal, 272(12), 3015-3025.
- Warrell, D. A., Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., & Williams, D. (2013). New approaches & technologies of venomics to meet the challenge of human envenoming by snakebites in India. The Indian journal of medical research, 138(1), 38.
- Williams, D. J., Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Wüster, W., Ratanabanangkoon, K., Paiva, O., ... & O'Shea, M. (2011). Ending the drought: new strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa. Journal of Proteomics, 74(9), 1735-1767.
- Yarlequé, A., Vivas, D., Inga, R., Rodríguez, E., Sandoval, G. A., Pessah, S., & Bonilla, C. (2008). Acción del antiveneno botrópico polivalente sobre las actividades proteolíticas presentes en los venenos de serpientes peruanas. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 25(2), 169-172.
- Yarlequé, M., Ortiz, C., Morante, Y., & Armando, Y. (2012). Estudio comparativo de algunas propiedades bioquímicas de venenos de serpientes

de diferentes regiones del mundo. Revista de la Sociedad Química del Perú, 78(1), 27-36.

- Greene, S. (2020). Coral snake envenomations in central and South America. Current Tropical Medicine Reports, 7(1), 11-16.
- Herrada, G., & León, D (2021). Características epidemiológicas de Casos de ofidismo registrados en el Perú durante el período 2010-2019.
- Minsa (2021). Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades (CDC). Situación Epidemiológica de los accidentes por animales ponzoñosos sujetos a vigilancia en el país.
- Biotech, A. P. (2001). Affinity Chromatography Handbook. Principles and methods.